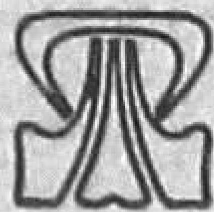
LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

DOTT. EMILIO VERATTI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO
delle colture dei tumori maligni in vitro

Dal Bollettino N. 1-2 del 1919 della Società Medico-Chirurgica di Pavia
(Comunicazione fatta nella seduta dell'11 aprile 1919)



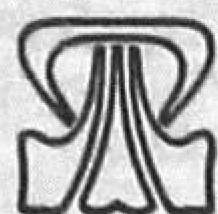
PAVIA
TIPOGRAFIA COOPERATIVA
1919

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

DOTT. EMILIO VERATTI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO delle colture dei tumori maligni in vitro

Dal Bollettino N. 1–2 del 1919 della Società Medico-Chirurgica di Pavia
(Comunicazione fatta nella seduta dell' 11 aprile 1919)



PAVIA
TIPOGRAFIA COOPERATIVA
1919

LABORATORIO DI PATOLOGIA GENERALE DELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

DOTT. EMILIO VERATTI

CONTRIBUTO ALLO STUDIO DELLE COLTURE DEI TUMORI MALIGNI IN VITRO

Appena risultò dimostrata dai lavori di Harrisson, di Burrows e di Carrel la possibilità di ottenere la sopravvivenza ed, entro certi limiti, la proliferazione di elementi cellulari degli organismi superiori in vitro nel plasma coagulato, da diversi autori fu tentata l'applicazione degli stessi metodi alle culture dei tumori maligni. Negli anni dal 1910 al 1914 infatti, fu un succedersi ininterrotto di pubblicazioni su questo argomento, che prendevano di mira singoli lati od aspetti del problema, ma si accordavano quasi senza eccezione nel risolvere in senso positivo la questione fondamentale della coltivabilità in vitro degli elementi neoplastici. Carrel e Burrows (1, 2, 3, 4, 5) furono i primi ad eseguire culture di diversi tumori umani: sarcoma della tibia, cancro del labbro, cancro del seno, sarcoma a cellule giganti, del sarcoma e del carcinoma trasmissibile dei ratti e dei topi, di un adenocarcinoma del cane e del cosi detto sarcoma di Rous dei polli, che però, come è noto, ormai si ritiene che non sia un vero tumore, ma un granuloma da causa infettiva. Inoltre applicarono il nuovo metodo allo studio della que-

stione, allora dibattuta, del meccanismo dell'immunità contro i tumori trasmissibili, studiando l'influenza del plasma normale e di animale sarcomatoso sullo sviluppo del sarcoma e sullo sviluppo dei tessuti normali di animali sani e portatori di sarcoma.

Di data poco posteriore sono i tentativi di cultura eseguiti da Volpino (20) sul cancro del topo in plasma di cavallo coagulato fino a consistenza gelatinosa, nei quali però l'A., più che delle modalità dello sviluppo del tessuto in vitro, si è occupato della durata della sopravvivenza degli elementi dimostrabile sperimentalmente coll'innesto.

Lambert e Hanes in una lunga serie di lavori (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) si occuparono in particolare delle culture di sarcomi e cancri tràsmissibili del ratto e del topo in plasma degli stessi animali normali, o portatori di tumori, od immunizzati con iniezione di tessuto neoplastico, e giunsero ad importanti risultati, fra i quali la dimostrazione che il tessuto di sarcoma di ratto, dopo essere stato coltivato in vitro per parecchi giorni, se viene inoculato in un animale suscettibile, attecchisce e dà luogo allo sviluppo di un nuovo tumore, fatto già affermato da Volpino pel cancro del topo, e che il plasma degli animali immuni naturalmente, od artificialmente immunizzati, non ha azione inibitrice sullo sviluppo del tumore. Inoltre studiarono la questione della formazione del grasso negli elementi dei tumori in cultura, quella delle cellule giganti o formazioni sinciziali polinucleate ed i movimenti ameboidi delle cellule sarcomatose e carcinomatose, rilevando l'importanza, che tali movimenti potrebbero avere nell'interpretazione generale della invasione degli elementi neoplastici nei tessuti sani e nel fenomeno della metastasi.

Lambert (7) studiò l'influenza del calore sulle culture

di sarcoma e giunse alla conclusione che le cellule di sarcoma in vitro sono più suscettibili all'azione del calore delle cellule dei tessuti normali, così che, combinando opportunamente il grado della temperatura e la durata del periodo di esposizione, si può riuscire ad impedire nelle culture lo sviluppo degli elementi del sarcoma, senza ostacolare quello degli elementi connettivali normali. In altro lavoro (8) illustrò le modalità della divisione dei nuclei (amitosi e cariocinesi) negli elementi cancerosi in cultura.

Maccabruni (17) nel 1914 eseguì una serie di culture di carcinomi uterini umani con risultati positivi, ma non potè sempre prolungare l'osservazione delle culture quanto sarebbe stato opportuno, perchè si urtò, al pari di tutti quelli che hanno usato il plasma umano come materiale di cultura per i tessuti normali o patologici, nella difficoltà rappresentata dalla liquefazione del plasma umano coagulato attorno al tessuto di cultura e conseguente arresto della proliferazione degli elementi, che si trovano privi della necessaria trama fibrinosa di sostegno.

Malgrado questo inconveniente, che tentò di eliminare con svariati ed ingegnosi espedienti, riuscì a dimostrare la proliferazione delle cellule concerose e delle cellule connettivali.

Loose e Ebeling (16) eseguirono culture di un sarcoma umano per diverse generazioni in plasma umano diluito; anch'essi osservarono il fenomeno della liquefazione del plasma, ma non in modo costante.

Gli altri accenni a culture di tumori, che si trovano nella letteratura (Doyen, Litchowsky, Champy ecc.), non aggiungono nulla di essenziale ai risultati del gruppo di lavori, che ho enumerato.

Io ho dapprima rivolto l'attenzione ai tumori trasmissibili dei topi e ratti, di cui a quel tempo possedevo di-

versi buoni ceppi, e riuscii infatti, sia con un carcinoma del topo, che con un sarcoma fusicellulare del ratto a rapido sviluppo, ad ottenere culture rigogliose, specialmente dal sarcoma, in plasma omologo puro o diluito con liquido di Ringer ed a constatare, per quanto riguarda le particolarità morfologiche degli elementi, le loro attitudini e le modalità della proliferazione, l'esattezza delle descrizioni date dagli autori, che si erano in precedenza occupati dell'argomento, e particolarmente quelle più minute e meglio illustrate da figure di Lambert e Hanes.

In seguito, viste le difficoltà di tecnica molto gravi, che presenta la cultura dei tumori dei topi e ratti, difficoltà inerenti sopratutto alla raccolta del sangue ed alla separazione del plasma, ho pensato di rivolgermi ai tumori spontanei dei cani, che non sono rari, offrono una notevole varietà di sede e di natura e si presentano particolarmente opportuni per ricerche culturali, per la facilità, colla quale dal cane è possibile ottenere tutto il plasma occorrente. Avevo da qualche mese soltanto iniziato queste ricerche, quando dovetti interromperle nella primavera del 1915, perchè chiamato ad altre occupazioni in conseguenza della guerra, così ho potuto completare lo studio delle culture di un solo tumore.

Malgrado la limitata estensione delle ricerche, m'induco ad esporne brevemente i risultati perchè, per quanto mi risulta, nella letteratura figura un solo caso di cultura di tumori di cane in un lavoro di Carrel e Burrows (5) del 1911, nel quale, riguardo ai risultati ottenuti, è detto solo che dal pezzo seminato si sono sviluppate colonne di cellule di apparenza epiteliale e manca ogni documentazione di figure.

Il tumore, dal quale sono partito, era un adenocarcinoma della regione mammaria in una vecchia cagna, pro-

veniente con ogni probabilità dalla ghiandola mammaria, di forma globosa, della grossezza di un piccolo uovo, coperto da pelle integra.

All'esame istologico risultò costituito da uno stroma di tessuto connettivo compatto, in alcuni punti decisamente fibroso, con numerosi focolai di degenerazione ialina e mucosa e piccole emorragie interstiziali antiche e recenti e da alveoli rivestiti da un epitelio generalmente monostratificato, di forma cilindrica o cubica. Di queste formazioni epiteliali alcune erano piccolissime, tanto che il lume ne era appena percettibile, altre invece ampie così da assumere il significato di vere cisti mono o pluriloculate, talora con parete liscia e regolare, talora con rivestimento epiteliale irregolare e fornito di sporgenze a guisa di papille. Nel ritagliare dal tumore i pezzetti per le culture ebbi cura di sceglierli nelle zone, anche macroscopicamente riconoscibili, dove non esistevano, od erano poco avanzati, i processi degenerativi dello stroma, evitai i punti, dove esistevano ampie formazioni cistiche, e cercai di colpire quelli, in cui il tumore era costituito da piccoli alveoli epiteliali con scarso tessuto connettivo intestiziale, in modo da avere la maggiore probabilità che, in ciascuno dei piccoli pezzi impiegati per allestire le culture, esistesse sempre qualche porzione di tessuto epiteliale.

Per l'esecuzione delle culture mi attenni ai metodi abituali: estrazione del sangue con pipette paraffinate dalla giungulare dello stesso animale portatore del tumore, separazione del plasma per centrifugazione a grande velocità, in ghiaccio, in provette paraffinate, culture su grandi copraoggetti deposti sopra vetri incavati dallo spessore di circa mezzo centimetro, asepsi scrupolosa in tutta l'operazione, incubazione in una stufa bene regolate a 37.5^{0}. Le culture, raccolte a diversi intervalli fra 5 e 10 giorni,

furono fissate in soluzioni di formalina al 10 % in soluzione fisiologica, incluse in paraffina, sezionate in serie e colorate con diversi metodi e di preferenza con ematossilina ferrica.

All' esame delle sezioni, ciò che innanzi tutto richiamò la mia attenzione fu il fatto che le due parti costituenti del tumore, la connettivale e l'epiteliale, si conservano entrambe in vita e si mostrano capaci di proliferare attivamente, a differenza di quanto avviene di solito nei tessuti normali adulti, nei quali gli elementi capaci di sopravvivere per lungo tempo in vitro e di proliferare sono esclusivamente quelli di natura connettivale.

Come di regola nelle culture dei tessuti, del frammento seminato tutta la parte centrale cade in necrosi, restano in vita solo gli elementi situati in una sottile zona periferica a contatto col materiale di cultura [zona fertile di Champy (6)], qui avvengono i fenomeni di proliferazione e da qui gli elementi neoformati si irradiano nel materiale di cultura attorno al pezzo occupando una zona più o meno estesa (zona di invasione di Champy). Se nel pezzo di tumore seminato, sempre molto piccolo, esisteva solo tessuto connettivo, oppure se vi esistevano anche degli alveoli epiteliali, ma questi non arrivavano in contatto colla periferia del pezzo, dopo cinque o sei giorni di incubazione si rileva che dalla periferia del pezzo, e di solito non uniformemente da tutta la periferia, come avviene nei tessuti normali, ma da alcuni punti soltanto, compaiono dei ciuffi di elementi connettivali neoformati, che si spingono nel materiale di cultura, contraendo fra loro evidenti anastomasi e costituendo una formazione reticolata affatto simile a quella che, nelle stesse condizioni, si forma, a spese del connettivo intestiziale, nelle culture dei tessuti normali. Fra le maglie di questa formazione ed anche dentro il tessuto se-

minato negli strati periferici, che si sono mantenuti in vita, si vedono in discreto numero degli elementi tondeggianti, a protoplasma abbondante finemente granuloso e spesso contenente detriti di tessuto inglobati per fagocitosi; questi elementi corrispondono evidentemente a quelli, che si osservano in abbondanza in tutte le culture di tessuti normali, e sui quali ho in altro lavoro (20) richiamato in particolare l'attenzione, dimostrando che essi derivano da quel gruppo di elementi dei connettivi normali, che si sogliono ora riunire sotto il nome generico di istiociti e che in passato erano indicati con diverse denominazioni: macrofagi, cellule avventiziali, cellule migranti, clasmatociti, cellule ragiocrine, cellule plasmatiche ecc, a seconda delle condizioni speciali e della fase funzionale, od evolutiva, nella quale erano stati osservati.

Anche nel connettivo di sostegno del tumore in esame quindi compaiono durante la proliferazione in vitro i due elementi essenziali, che si osservano nella proliferazione dei tessuti connettivi normali: fibroblasti ramificati ed anastomizzati fra loro a costituire un formazione reticolata e fagociti mobili migranti liberamente nel tessuto e nel materiale di cultura.

Se nel pezzetto seminato un'alveolo epiteliale si trova in rapporto colla superficie di taglio, accade di regola che gli elementi epiteliali costituenti la parete dell' alveolo proliferano molto rapidamente ed invadono poco a poco tutta le superficie del pezzo, formando a questo un completo involucro costituito da parecchi strati di cellule epiteliali. Quando ciò avviene manca la proliferazione del tessuto connettivo, quasi che la presenza dello strato epiteliale di rivestimento costituisca una barriera insuperabile per le cellule connettive. Con questo processo la cultura viene ad assumere la forma di una piccola cisti con una parete

di epitelio neoformato ed un contenuto rappresentato dai residui del pezzo di tessuto seminato quasi totalmente caduto in necrosi.

Un fenomeno affatto simile è stato osservato da Uhlenhut (18) in culture di pelle di rana in plasma sanguigno della stessa specie mescolato ad estratto di muscolo; il frammento di pelle si trasforma in una sfera epiteliale cava riempita di tessuto connettivo; questo non prolifera, perchè anche qui la barriera di elementi epiteliali, rapidamente formatasi attorno al pezzo, costituisce un ostacolo al passaggio degli elementi del connettivo.

La cellule, che costituiscono lo strato di rivestimento alla superficie del pezzo, sono di forma e di grandezza varia; in generale tendono ad assumere forma fusata disponendosi coll'asse maggiore parallelamente alla superficie del pezzo, ed hanno dimensioni più grandi di quelle degli elementi epiteliali del tumore. Malgrado queste differenze, non vi è dubbio che tali cellule siano di natura epiteliale e derivate dal rivestimento degli alveoli del tumore, perchè in molti punti con tutta evidenza si assiste al passaggio graduale dall' epitelio di rivestimento degli alveoli, costituito da elementi piccoli, di forma cubica o cilindrica, disposti in un solo strato regolare, a questi accumuli polistratificati di elementi grandi di forma fusata. La fig. 2, dove è riprodotto a piccolo ingrandimento un tratto esteso del rivestimento epiteliale di una cultura, in parte costituito da elementi del tutto simili a quelli, che rivestivano gli alveoli del tumore, ed in parte da cellule fusate grandi, polistratificate, dimostra la continuità indiscutibile fra gli elementi dei due tratti di rivestimento e la graduale modificazione di forma e di grandezza degli elementi che lo costituiscono.

Nella fig. 3 la zona di passaggio fra gli elementi del

tumore ed il rivestimento epiteliale neoformato in cultura è riprodotta a più forte ingrandimento, per mettere meglio in evidenza la graduale modificazione dei caratteri morfologici degli elementi e la continuità fra le due formazioni.

Dallo strato di rivestimento neoformato irradiano nel materiale di cultura delle colonne di elementi, a guisa di zaffi, che si spingono a considerevole distanza; le cellule, che li costituiscono, hanno dimensioni piuttosto grandi, forma di solito ovale coll' asse maggiore parallelo all' asse della colonna o zaffo, sono quindi orientati in senso normale alle cellule del rivestimento, dal quale evidentemente derivano. Sia nel rivestimento, che negli zaffi, e specialmente nella parte basale di questi, si osservano figure cariocinetiche in discreto numero (Fig. 1).

In alcuni casi, quando la vegetazione dell' epitelio è più rigogliosa, si formano in dipendenza dello strato di rivestimento delle grosse propaggini, che si insinuano libere nel materiale di cultura, e sono costituite da cellule epiteliali in numero considerevole. In queste vegetazioni le cellule appaiono molto inuguali di forma e di grandezza ed assumono fra loro rapporti complicati; spesso, per esempio, costituiscono delle formazioni a strati concentrici, quali di frequente si osservano nei cancri di origine epidermica. Questo reperto, che è riprodotto nella fig. 4, ha un certo interesse perchè nel tumore usato per le culture non esisteva traccia di una disposizione di questo genere. Si ha quindi ragione di ritenere che l'epitelio neoplastico, proliferando in cultura, possa dar luogo a formazioni molto più atipiche di quelle presenti nel tumore.

Quando il materiale di cultura in vicinanza del pezzo seminato subisce una parziale liquefazione, come accade non di rado per ragioni, che non è possibile precisare, se il pezzo contiene dell' epitelio, che affiora in vicinanza del va-

cuolo così formatosi, esso prolifera e gli elementi neoformati, invece di aderire alla superficie del pezzo disponendosi a formare quello strato di rivestimento, che sopra abbiamo descritto, si adattano alla superficie del materiale di cultura e finiscono col costituire delle vescicole, qualche volta molto ampie, il contenuto delle quali è rappresentato dalla parte liquefatta del materiale di cultura.

Un esempio tipico di questa curiosa disposizione è offerto dalla fig. 5, disegnata a piccolo ingrandimento appunto per poter abbracciare la formazione vescicolare nel suo complesso.

In un precedente lavoro sulle culture dei tessuti normali ho accennato alla tendenza, che alcuni elementi connettivi hanno a disporsi a rivestire la superficie libera di fenditure o vacuoli nel materiale di cultura; qui la stessa funzione, ma in proporzioni molto più cospicue, è compiuta da elementi di natura epiteliale. Anche in questo caso, come abbiamo fatto per le accennate formazioni delle culture di tessuti normali, si potrebbe porre la questione quali siano le forze che inducono degli elementi, che si sviluppano liberamente, ad assumere quella ben definita disposizione; se si tratti di forze fisiche o di una manifestazione di particolari attività biologiche delle cellule. Non credo che neppure con queste nuove osservazioni il problema possa essere risolto, resta solo raggiunta la dimostraziane che la tendenza a disporsi sulle superfici libere non è legata alla natura degli elementi, poichè si osserva tanto nelle cellule connettive dei tessuti normali, quanto negli elementi di natura indubbiamente epiteliale di questo tumore.

Riassumendo, i fatti, a mio avviso, di qualche interesse, che risultano dallo studio delle culture di un adeno-carcinoma mammario del cane, di cui ho esposto brevemente i risultati, sono i seguenti:

1.° La accertata sopravvivenza e proliferazione in un tumore misto, sia degli elementi epiteliali, che degli elementi del connettivo di sostegno, a differenza di quanto avviene in generale nei tessuti adulti normali, nei quali solo il connettivo soppravvive e prolifera.

2.° La tendenza dell'epitelio neoformato in cultura a disporsi alla superficie di taglio del tessuto seminato, formando uno strato di rivestimento continuo, e sulla superficie libera del materiale di cultura, quando questo venga in parte liquefatto, costituendo delle estese formazioni vescicolari.

3.° La possibilità che in cultura si generino formazioni epiteliali molto più atipiche di quelle esistenti nel tumore.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI CITATE

1. Carrel A. — On the permanent life of tissues outside of the organism.
   Journ. Exp. Med. Vol. 15, p. 516; 1912.
2. Carrel A. and Burrows M. T. — Human sarcoma cultivated outside of the body.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 55, p. 1732; 1910.
3. Carrel A. and. Burrows M. T. — Cultivation of sarcoma outside of the body.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 55, p. 1554; 1910.
4. Carrel A. and Burrows M. T. — Artificial stimulation and inhibition of the growth of normal and sarcomatous tissues.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 56, p. 32; 1911.
5. Carrel A. and Burrows M. T. — Cultivation in vitro of malignant tumors.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 13, p. 571; 1911.
6. Champy. — La différentiation des tissues cultivés en dehors de l' organisme.
   Bibl. Anat. T. 23; 1913.
7. Lambert R. A. — Demonstration of the greater susceptibility to heat of sarcoma cells.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 59, p. 2147; 1912.
8. Lambert R. A. — Comparative studies upon cancer cells and normal cells.
   Journ. Exp. Med. Vol. 17, p. 500; 1913.
9. Lambert and Hanes. — Growth in vitro of the transplantable sarcoma of rats and mices.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 56, p. 33; 1911.
10. Lambert and Hanes. — Cultivation in vitro of rat sarcoma. A study in Immunity.
   Journ. Am. Med. Ass. Vol. 56, p. 587; 1911.

11. Lambert and Hanes. — Characteristics of growth of sarcoma and carcinoma cultivated in vitro.
Journ. Exp. Med. Vol. 13, p. 495; 1911.

12. Lambert and Hanes. — A studv of cancer immunity by the method of cultivating tissues ontside the body.
Journ. Exp. Med. Vol. 13, p. 505; 1911.

13. Lambert and Hanes. — The cultivation of tissues in plasma from alien species.
Journ. Exp. Med. Vol. 14, p. 129; 1911.

14. Lambert and Hanes. — The cultivation of tissues in vitro as a method for the study of cytotoxins.
Journ. Exp. Med. Vol. 14, p. 453; 1911.

15. Lambert and Hanes. — Amoeboide Bewegungen von Krebszellen als ein Faktor der invasiven und metastatischen Wachstums maligner Tumoren.
Virchow's Arch. Bd. 209, S. 1; 1912. - Vedi anche Journ. Am. Med. Ass. Vol. 56, p. 791; 1914.

16. Loose and Ebeling. — The cultivation of human sarcomatous tissue in vitro.
Journ. Exp. Med. Vol. 20, p. 140; 1914.

17. Maccabruni. — Esperienze di coltivazione in vitro del cancro uterino umano.
Ann. Ostetricia e Ginecologia. V. 36, p. 57; 1914.

18. Uhlenhut. — Cultivation of the skin epithelium of the adult frog.
Journ. of Exp. Med. Vol. 20 p. 614; 1914.

19. Veratti. — Ricerche istologiche su alcuni tessuti in istato di sopravvivenza in vitro.
Boll. Soc. Med. Pavia; 1919.

20. Volpino. — Alcune esperienze sul cancro trapiantabile dei topi.
Pathologica. Anno 2, p. 495; 1910.

Spiegazione delle Figure.

Tutte le figure sono ricavate da culture di un adeno-carcinoma della mammella di una cagna in plasma dellò stesso animale.

Fig. 1. — Colonna di cellule epiteliali neoformate, che emerge dal pezzo seminato e si spinge a guisa di zaffo nel materiale di cultura. Obb. 2 mm. Ap. Zeiss, oc. 4 C.

Fig. 2. — Porzione della superficie del pezzo seminato ricoperta da uno strato continuo di cellule epiteliali. Obb. 5 Kor. oc. 4 C.

Fig. 3. — Porzione della superficie del pezzo seminato ricoperta da elementi epiteliali: punto di passaggio dall' epitelio cubico monostratificato del tipo di quello, che rivestiva gli alvcoli del tumore, all' epitelio atipico polistratificato, neoformato in cultura. Obb. 3 mm. Ap. Kor. oc. 4 C.

Pig. 4. — Zaffo di cellule epiteliali cresciute liberamente nel materiale di cultura, costituito da cellule, per forma, grandezza e disposizione, atipiche in confronto degli elementi epiteliali del tumore. Obb. 3 mm. Ap. Kor. oc. 4 C.

Fig. 5. — Sezione completa di una cultura: l'epitelio, disponendosi a rivestire in istrato sottile la superfice del materiale di cultura in parte fluidificato in prossimità del prezzo seminato, dà luogo ad una formazione vescicolare. Obb. 2 Kor. oc. 1.

Fig. 1.

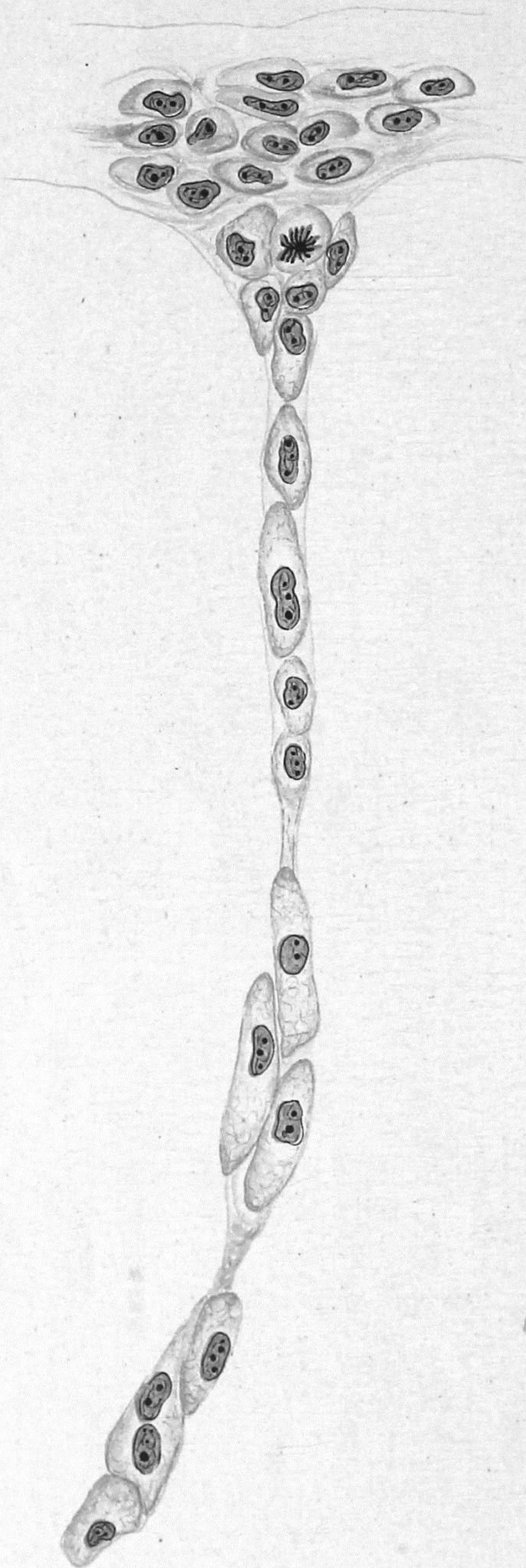
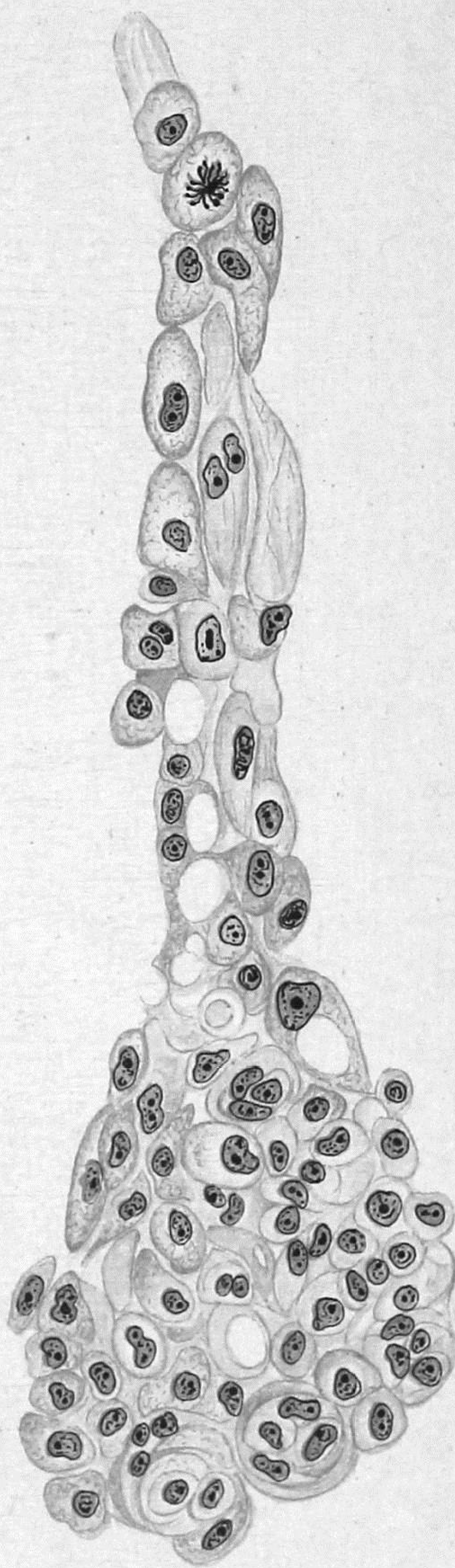
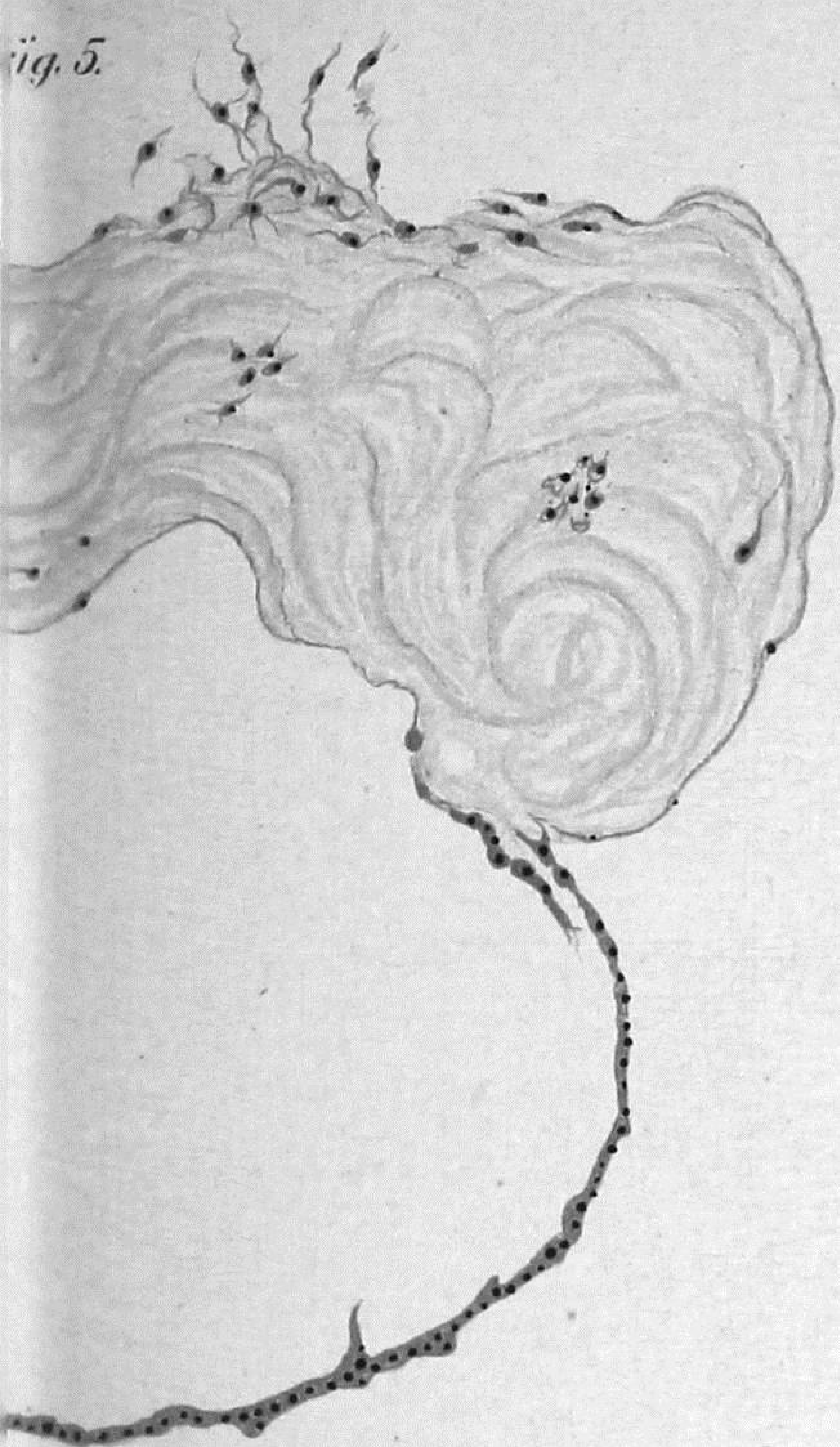
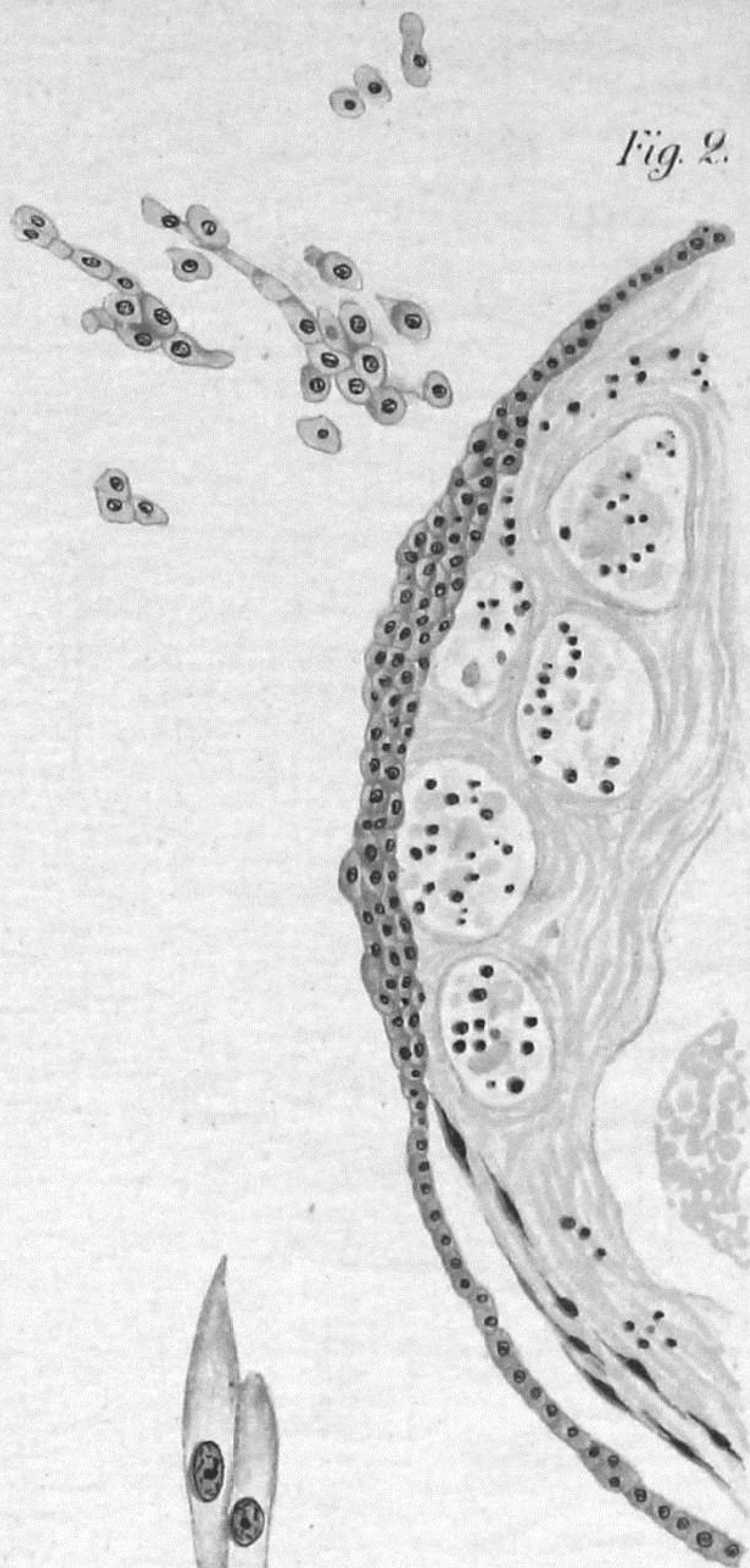


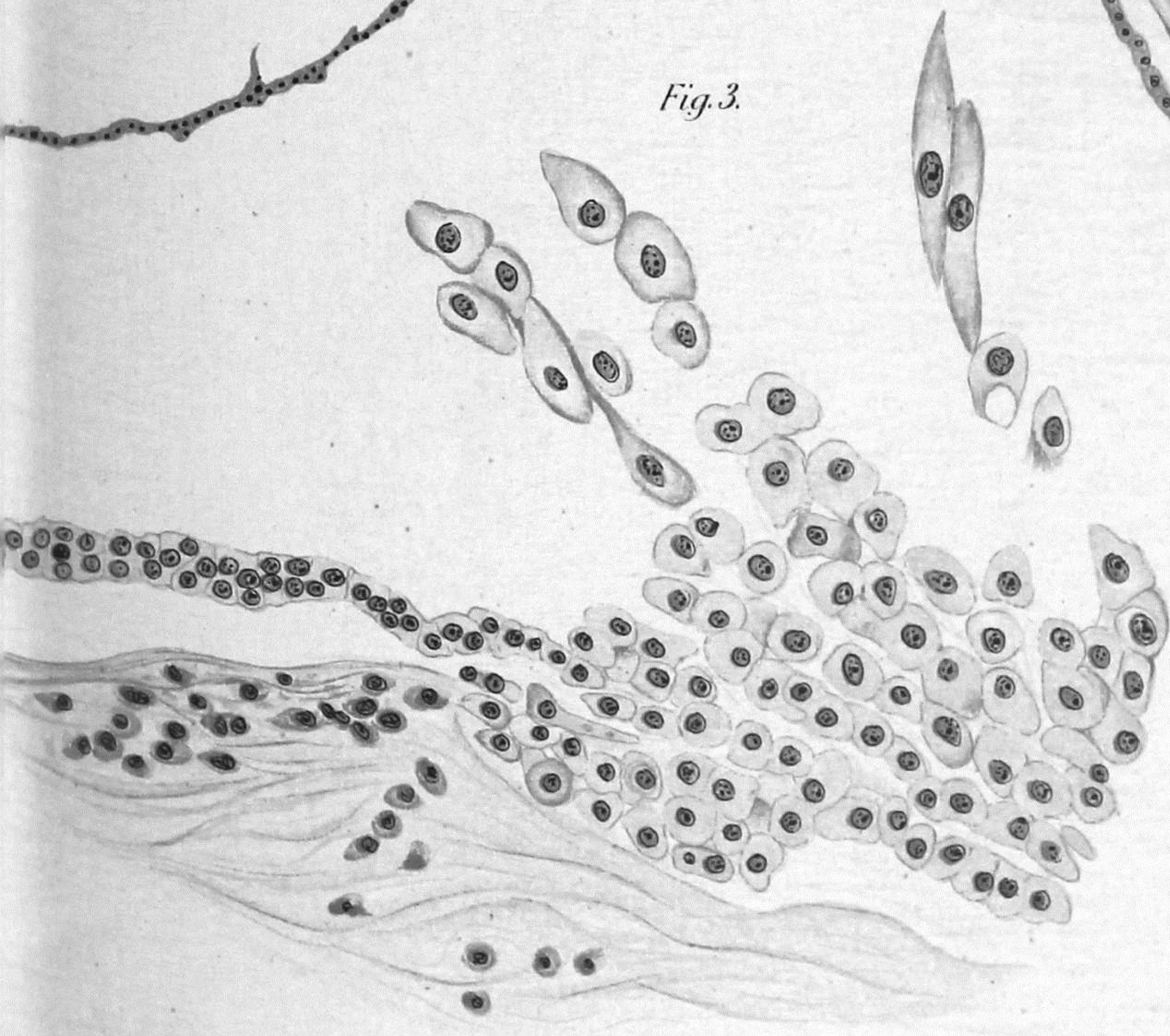
Fig. 4.











Lit. Succ. Tacchinardi e Ferrari-Pavia